

# BEST AVAILABLE COPY

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-110328

(43)Date of publication of application : 25.04.1995

(51)Int.Cl.

G01N 33/48

G01N 1/30

(21)Application number : 05-252699

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 08.10.1993

(72)Inventor : KOJIMA YASUAKI  
YABE RIYOUHEI  
HATTORI MITSUO  
KAWASE KAZUMITSU

### (54) DYEING REAGENT AND METHOD FOR ADJUSTING AND USING THE SAME

#### (57)Abstract:

PURPOSE: To prevent aggregation and sedimentation reactions in blending a dyeing reagent of a biosample by a method wherein a pH buffer solution and a stabilizer are added to an azo dye and a xanthene dye as pigment for dyeing cells and structures to make the dye reagent of the biosample.

CONSTITUTION: One pt.vol. of about 0.2 to  $10 \times 1/102$ mol/l Evans blue or typan blue is mixed with about 0.5-2 pts.vol. of about 0.2 to  $10 \times 1/102$ mol/l Erythrosine. Sodium azide, parahydroxyphenyl acetate, or dehydroacetate is mixed into the solution to obtain its 0.01-1% solution. The solvent used is a phosphoric acid solution, a succinic acid solution, a trisic acid solution of about 1/30-1/5mol% in concentration, and pH is kept at about 5.7-7.9. As fixing agent, any of glutaric aldehyde, formaldehyde and the like is added to be 0.02-5% in concentration. This makes the dyeing of a tangible component specifically and the obtaining of a dye image with high visual recognizability possible.

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 06.10.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3039594

[Date of registration] 03.03.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] It is the dyeing reagent of the biological material which consists of a cell and the coloring matter for organization dyeing, the pH buffer solution, and a stabilizer. Said cell and coloring matter for organization dyeing Consist of two or more coloring matter for dyeing of a non-polar molecule, even if it mixes mutually, react, and condensation and precipitate are not caused, and deposit, and do not make melts, such as sugar in said biological material, protein, and glycoprotein, condense, and about two or more dyeing objects It is the dyeing reagent characterized by dyeing in various colors with the different color tone or the dyeing reinforcement for every class of the, and making it dye in various colors by the color tone or dyeing reinforcement which is different for every structure of the about the same object.

[Claim 2] Two or more coloring matter for dyeing is a dyeing reagent according to claim 1 characterized by being with the azo dye used for supravital staining, and xanthene dye.

[Claim 3] Azo dye is a dyeing reagent according to claim 2 characterized by being either Evans Blue or a trypan blue.

[Claim 4] Xanthene dye is any according to claim 2 or 3 or the dyeing reagent characterized by being either Erythrosine, the phloxine or eosine.

[Claim 5] pH buffer solution is the dyeing reagent of claim 1 characterized by being either phosphoric-acid liquid, succinic-acid liquid or tris acid liquid thru/or 4 publications either.

[Claim 6] A stabilizer is the dyeing reagent of claim 1 characterized by being an antimicrobial agent thru/or 5 publications either.

[Claim 7] An antimicrobial agent is a dyeing reagent according to claim 6 characterized by being either a sodium-azide object, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid.

[Claim 8] Any 1 capacity of Evans Blue of  $10.0 \times 1 / [\text{about } 0.2 - ] 102 \text{ mol/l}$ , or a trypan blue, The Erythrosine about 0.5 to 2.0 capacity of  $10.0 \times 1 / [\text{about } 0.2 - ] 102 \text{ mol/l}$  is mixed. Either a sodium azide, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid is mixed so that it may become said mixed solution with about 0.01 - 1.0% of concentration. The preparation approach of the dyeing reagent characterized by making it pH set to 5.7-7.9, using either the phosphoric-acid liquid of  $1/30 - 1/5 \text{ mol/l}$ , succinic-acid liquid or tris acid liquid as a solvent.

[Claim 9] Operation of the dyeing reagent characterized by adding and using a fixed agent for the dyeing reagent which consists of a cell and the coloring matter for organization dyeing, the pH buffer solution, and a stabilizer.

[Claim 10] Any 1 capacity of Evans Blue of  $10.0 \times 1 / [\text{about } 0.2 - ] 102 \text{ mol/l}$ , or a trypan blue, Phloxine about 0.5 to 2.0 capacity of  $10.0 \times 1 / [\text{about } 0.2 - ] 102 \text{ mol/l}$  is mixed. Either a sodium azide, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid is mixed so that it may become said mixed solution with about 0.01 - 1.0% of concentration. Into the dyeing reagent adjusted so that pH might be set to 5.7-7.9, using either the phosphoric-acid liquid of  $1/30 - 1/5 \text{ mol/l}$ , succinic-acid liquid or tris acid liquid as a solvent as a fixed agent Operation of the dyeing reagent according to claim 9 characterized by adding and using either a glutaraldehyde, formaldehyde or a paraformaldehyde so that it may become 0.02 - 5.0%, and concentration.

[Claim 11] Operation of the dyeing reagent characterized by adding and using a fixed agent and a surfactant for the dyeing reagent which consists of a cell and the coloring matter for organization dyeing, the pH buffer solution, and a stabilizer.

[Claim 12] About 0.2 to  $10.0 \times 1 / 102 \text{ mols } [1.]$  Evans Blue 1 capacity, Eosine about 0.5 to 2.0 capacity of  $10.0 \times 1 / [\text{about } 0.2 - ] 102 \text{ mol/l}$  is mixed. Either a sodium azide, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid is mixed so that it may become said mixed solution with about 0.01 - 1.0% of concentration. Into the dyeing reagent adjusted so that pH might be set to 5.7-7.9, using either the phosphoric-acid liquid of  $1/30 - 1/5 \text{ mol/l}$ , succinic-acid liquid or tris acid liquid as a solvent as a fixed agent So that it may become 0.02 - 5.0%, and concentration Either a glutaraldehyde, formaldehyde or a paraformaldehyde. Operation of the dyeing reagent according to claim 11 characterized by adding and using sodium dodecyl sulfate as a surface active agent so that it may become 0.01 - 0.5% of concentration.

[Claim 13] Trypan blue 1 capacity of  $10.0 \times 1 / [\text{about } 0.2 - ] 102 \text{ mol/l}$ , Eosine about 0.5 to 2.0 capacity of  $10.0 \times 1 / [\text{about } 0.2 - ] 102 \text{ mol/l}$  is mixed. Either a sodium azide, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid is mixed so that it may become said mixed solution with about 0.01 - 1.0% of concentration. Into the dyeing reagent adjusted so that pH might be set to 5.7-7.9, using either the phosphoric-acid liquid of  $1/30 - 1/5 \text{ mol/l}$ , succinic-acid liquid or tris acid liquid as a solvent as a fixed agent So that it may become 0.02 - 5.0%, and concentration Either a glutaraldehyde, formaldehyde or a paraformaldehyde. Operation of the dyeing reagent according to claim 11 characterized by adding and using sodium dodecyl sulfate so that it may become 0.01 - 0.5% of concentration as a surface active agent.

[Claim 14] Operation of claim 1 to which the biological material for dyeing is characterized by being an urinary sediment concreteness component thru/or one dyeing reagent of 13.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

**DETAILED DESCRIPTION**

**[Detailed Description of the Invention]**

**[0001]**

**[Industrial Application]** This invention relates to a dyeing reagent which the biological material in which impurity, such as precipitate of coloring matter, a deposit and aggregate of the component in urine, and a dust contaminant, and discernment contain a difficult extracellular concreteness component, i.e., a crystal, a cylinder, etc. in the same sample besides cell components, such as an erythrocyte, a leucocyte, and an epithelial cell, like especially urine is dyed, its preparation approach, and its operation about the dyeing reagent for biological material dyeing, such as an erythrocyte, a leucocyte, and an epithelial cell.

**[0002]**

**[Description of the Prior Art]** As a well-known example nearest to the dyeing reagent and the preparation approach of this invention, they are inspection and a technique. \*\*\*\*\* vol.10 No.9 (1982:9) The technique of publications, such as p846-p850, and JP,5-40118,A, is mentioned. Inspection and the technique of the above [ reagent / conventional / urinary sediment dyeing ] \*\*\*\*\* vol.10No.9 (1982:9) As it is also in the technique of publications, such as p846-p850, and JP,5-40118,A, a SUTERUNHAIMA (Sternheimer) dyeing reagent, a SUTERUNHAIMA strange method (New Sternheimer) dyeing reagent, a SUTERUNHAIMA malvin (Sternheimer-Malbin) dyeing reagent, etc. exist.

**[0003]** Said SUTERUNHAIMA dyeing reagent was mixing I liquid and II liquid at a rate of 1:1, in order to have consisted of I liquid of 2% National first blue (National fast blue) water solution, and II liquid of a 1.5% pyronin B (PyroninB) water solution and to have prepared this dyeing reagent. Moreover, the SUTERUNHAIMA strange method dyeing reagent was mixing I liquid and II liquid at a rate of 2:1, in order to have consisted of I liquid of 2% Alcian Blue (Alcian blue) water solution, and II liquid of a 1.5% pyronin B (PyroninB) water solution and to have prepared this dyeing reagent.

**[0004]** Said SUTERUNHAIMA malvin dyeing reagent was mixing I liquid and II liquid at a rate of 3:97, in order to have consisted of I liquid which dissolves crystal violet 3.0g in ethyl alcohol 20.0ml 95%, adds 0.8g of ammonium oxalates to this, and it comes to dilute with 80.0ml of purified water, and II liquid which dissolves 0.25g of safranin O in ethyl alcohol 10.0ml 95%, and comes to dilute this with 100.0ml of purified water and to have prepared this dyeing reagent.

**[0005]**

**[Problem(s) to be Solved by the Invention]** The staining technique of the urinary sediment using the above-mentioned conventional SUTERUNHAIMA dyeing reagent and a SUTERUNHAIMA strange method dyeing reagent is high supravital stain of the usefulness excellent in the visibility of the concreteness component in urine. However, said dyeing reagent may overlook said various material components, when condensation of melts, such as protein in urine, sugar, and glycoprotein, was caused, it mistakes this for a cylinder or a cell, a cylinder, a corpuscle, etc. are hidden into an aggregate at the time of mixing with urine, since it is the polar molecule with which charge distribution of the configuration coloring matter intramolecular is unevenly distributed. Furthermore, when the image processing of said various material components was carried out, the big technical problem that it became the cause of malfunction of an image processing system occurred.

**[0006]** Moreover, the staining technique of the urinary sediment using a SUTERUNHAIMA malvin dyeing reagent was inferior to the visibility of the concreteness component in urine from the above-mentioned staining technique, and the tyrosine's needlelike crystal was sometimes produced, and it had the big technical problem that it will mistake for the crystal of the origin among urine. Moreover, the technical problem that calculation of the number of red cell by erythrocyte hemolysis became incorrectness occurred.

**[0007]** Then, this invention was not made in order to solve the above-mentioned technical technical problem, it does not cause condensation of melts, such as protein in urine, sugar, and glycoprotein, does not produce the tyrosine's crystal, does not have the erythrocyte hemolysis of a stain solution reason, is excellent in the visibility of the concreteness component in urine, and its calculation of a number of red cell is exact, and it aims at offering the dyeing reagent with which the chromatic figure also suitable for an image processing is obtained, its adjustment approach, and its operation.

**[0008]**

**[Means for Solving the Problem]** The dyeing reagent of the biological material which starts this invention in order to attain the above-mentioned purpose It is the dyeing reagent of the biological material which consists of a cell and the coloring matter for organization dyeing, the pH buffer solution, and a stabilizer. Said cell and coloring matter for organization dyeing Consist of two or more coloring matter for dyeing of a non-polar molecule, even if it mixes mutually, react, and condensation and precipitate are not caused. and deposit, and do not make melts, such as sugar in said biological material, protein, and glycoprotein, condense, and about two or more dyeing objects It is characterized by dyeing in various colors with the different color tone or the dyeing reinforcement for every class of the, and making it dye in various colors by the color tone or dyeing reinforcement which is

different for every structure of the about the same object.

[0009] Two or more coloring matter for dyeing is characterized by being with the azo dye used for supravital staining, and xanthene dye. Azo dye is characterized by being either Evans Blue or a trypan blue. Xanthene dye is characterized by being either Erythrosine, the phloxine or eosine. pH buffer solution is characterized by being either phosphoric-acid liquid, succinic-acid liquid or tris acid liquid. A stabilizer is characterized by being an antimicrobial agent. Said antimicrobial agent is characterized by being either a sodium-azide object, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid.

[0010] The preparation of the dyeing reagent of the biological material which starts this invention in order to attain the above-mentioned purpose Any 1 capacity of Evans Blue of 10.0x1/[ about 0.2 - ] 102 mol/l, or a trypan blue, The Erythrosine about 0.5 to 2.0 capacity of 10.0x1/[ about 0.2 - ] 102 mol/l is mixed. Either a sodium azide, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid is mixed so that it may become said mixed solution with about 0.01 - 1.0% of concentration. It is characterized by making it pH set to 5.7-7.9, using either the phosphoric-acid liquid of 1/30 - 1/5 mol/l, succinic-acid liquid or tris acid liquid as a solvent.

[0011] Operation of the dyeing reagent of the biological material which starts this invention in order to attain the above-mentioned purpose is characterized by adding and using a fixed agent for the dyeing reagent which consists of a cell and the coloring matter for organization dyeing, the pH buffer solution, and a stabilizer. Any 1 capacity of Evans Blue of 10.0x1/[ about 0.2 - ] 102 mol/l, or a trypan blue, Phloxine about 0.5 to 2.0 capacity of 10.0x1/[ about 0.2 - ] 102 mol/l is mixed. Either a sodium azide, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid is mixed so that it may become said mixed solution with about 0.01 - 1.0% of concentration. Into the dyeing reagent adjusted so that pH might be set to 5.7-7.9, using either the phosphoric-acid liquid of 1/30 - 1/5 mol/l, succinic-acid liquid or tris acid liquid as a solvent as a fixed agent It is characterized by adding and using either a glutaraldehyde, formaldehyde or a paraformaldehyde so that it may become 0.02 - 5.0%, and concentration.

[0012] Moreover, it is characterized by adding and using a fixed agent and a surfactant for the dyeing reagent which consists of a cell and the coloring matter for organization dyeing, the pH buffer solution, and a stabilizer. About 0.2 to 10.0x1 / 102 mols [l. ] Evans Blue 1 capacity, Eosine about 0.5 to 2.0 capacity of 10.0x1/[ about 0.2 - ] 102 mol/l is mixed. Either a sodium azide, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid is mixed so that it may become said mixed solution with about 0.01 - 1.0% of concentration. Into the dyeing reagent adjusted so that pH might be set to 5.7-7.9, using either the phosphoric-acid liquid of 1/30 - 1/5 mol/l, succinic-acid liquid or tris acid liquid as a solvent as a fixed agent It is characterized by either the glutaraldehyde, formaldehyde or the paraformaldehyde and adding and using sodium dodecyl sulfate so that it may become 0.01 - 0.5% of concentration as a surface active agent so that it may become 0.02 - 5.0%, and concentration.

[0013] Moreover, about 0.2 to 10.0x1 / 102 mols [l. ] trypan blue 1 capacity, Eosine about 0.5 to 2.0 capacity of 10.0x1/[ about 0.2 - ] 102 mol/l is mixed. Either a sodium azide, a PARAHAIDOROKISHI phenylacetic acid, a dehydroacetic acid or an ethylenediamine tetra-sulfuric acid is mixed so that it may become said mixed solution with about 0.01 - 1.0% of concentration. Into the dyeing reagent adjusted so that pH might be set to 5.7-7.9, using either the phosphoric-acid liquid of 1/30 - 1/5 mol/l, succinic-acid liquid or tris acid liquid as a solvent as a fixed agent It is characterized by either the glutaraldehyde, formaldehyde or the paraformaldehyde and adding and using sodium dodecyl sulfate so that it may become 0.01 - 0.5% of concentration as a surface active agent so that it may become 0.02 - 5.0%, and concentration. The biological material for dyeing is characterized by being an urinary sediment concreteness component.

[0014] In determining a presentation and its preparation approach of the reagent for urinary sediment dyeing concerning this invention, the following experiment was conducted. Each experimental result was shown in Tables 1-2 and drawing 1 -4.

[Example of experiment 1] About 40 kinds of coloring matter with the structure expression first guessed that the charge of intramolecular is not unevenly distributed centering on a cell and the coloring matter for organization dyeing was chosen centering on azine system coloring matter, a xanthene dye, azo system coloring matter, thiazin system coloring matter, triphenylmethane color system coloring matter, etc.

[0015] And 200micro of healthy human urine I was added to 80micro of stain solutions I prepared to 6.3x1/103 mol/l, and condensation of the protein in urine, sugar, glycoprotein, etc. took place, or it checked by microscope observation. Consequently, 13 kinds (reddish [ six kinds of ], seven kinds of blue systems) of coloring matter shown in [Table 1] as coloring matter which does not cause condensation was obtained.

[0016] [Table 1] is the list of the coloring matter with which it became clear that there is no condensation ability of the melt in urine as a result of examining a cell and the coloring matter for organization dyeing. In addition, C.I.No. means a Color Index number.

[Table 1]

No.	色 素 名	C. I. No.	ピーク波長(nm)
1	ニュートラル レッド	50040	530.6
2	エオシン ワイ	45380	516.4
3	フロキシシン ビー	45410	538.2
4	エリトロシン	45430	526.4
5	コンゴ レッド	22120	498.2
6	アソカルミン ジェフェム	50085	523.4
7	メチレン ブルー	52015	590.0
8	エバンス ブルー	23860	608.0
9	アズール ビー	52010	646.4
10	メチレン グリーン	42590	632.0
11	ファスト グリーン エフシエフ	42053	623.0
12	ニューメチレン ブルー	52030	590.2
13	トリパン ブルー	23850	599.0

[0017] [Example of experiment 2] Next, according to the matrix shown in [Table 2], the existence of precipitate generating by the condensation by the combination of reddish coloring matter and the coloring matter of a blue system was checked by microscope observation. And as a result of mixing the stain solution prepared to  $6.3 \times 10^3$  mol/l every [ 50micro / l ], it checked that the crystal of the precipitate by 25 kinds of coloring matter combination shown by front Naka O or O or a coloring matter proper was not generated.

[0018] [Table 2] shows the existence of generating of the precipitate in the combination of two or more coloring matter, x and the thing which is not generated considered as O, it did not generate and what has the good dye affinity of a cell considered as the notation of O what generates precipitate.

[Table 2]

	赤系色素	ニュートラル レッド	エオシン ワイ	フロキシ シン ビー	エリトロ シン	コンゴ レッド	アソカル ミンジェ フェム
青系色素							
メチレン ブルー		○	×	×	×	×	×
エバンス ブルー		○	⊗	⊗	⊗	○	○
アズール ビー		○	○	○	○	×	○
メチレン グリーン		○	×	×	×	×	×
ファスト グリーン		×	○	○	○	○	○
ニューメチレン ブルー		○	×	×	×	×	×
トリパン ブルー		○	○	○	⊗	○	○

[0019] Furthermore, in order to acquire combination with the sufficient dye affinity of a cell from 25 kinds of combination, 200micro of healthy human urine I was mixed with 80micro of stain solutions I, and the combination which can do the dyeing reason of the nucleus of an epithelial cell and cytoplasm was examined. Consequently, the good dye affinity was acquired in four kinds of combination shown by O during the above [Table 2].

[0020] Drawing 1 is the diagram showing the relative color tone of cytoplasm, and a nuclear relative color tone. In drawing 1, the nucleus of the epithelial cell when dyeing in the combination of Evans Blue (Evans blue) and Erythrosine (Erythrosine) and the color tone of cytoplasm are measured with the microspectrophotometer of 2 micrometers of photometry spot \*\*\*\*, and the result of having asked for the ratio of the peak of Evans Blue (Evans blue) and the peak of Erythrosine (Erythrosine) is shown. From this, the orthochromatic dye concerning this invention was blue in the nucleus, and checked dyeing cytoplasm red.

[0021] [Example of experiment 3] Comparison examination of the condensation ability of the melts in urine (protein, sugar, glycoprotein, etc.) was carried out with the SUTERUNHAIMA strange method (New Sternheimer) dyeing reagent and the SUTERUNHAIMA malvin (Sternheimer-Malbin) dyeing reagent especially about two kinds of combination of the inside of four kinds of combination which was the fitness of a dye affinity, Evans Blue (Evansblue), Erythrosine (Erythrosine) and Evans Blue (Evans blue), and the phloxine (Phloxine). 1ml of healthy human urine was mixed with 400micro (no dyeing is physiological saline 400microl) of each stain solution I, and the particle number was compared using the particle counter.

[0022] In addition, the presentation of a stain solution is as follows.

Dyeing urine [ -- SUTERUNHAIMA strange method (New Sternheimer) dyeing reagent + healthy human urine [0023] ] 1 -- SUTERUNHAIMA malvin (Sternheimer-Malbin) dyeing reagent + healthy human urine dyeing urine 2 -- Evans Blue (Evans blue) and phloxine (Phloxine) + healthy human urine dyeing urine 3 -- Evans Blue (Evans blue) and Erythrosine (Erythrosine) + healthy human urine dyeing urine 4 Drawing 2 is the diagram showing relation with the aggregate in dyeing urine and its urine. As the result was shown in the bar graph of drawing 2, the number of counts of SUTERUNHAIMA strange method (NewSternheimer)

urine was 196-piece/microl, the number of counts (two-piece/microl) 90 times the value of non-dyed urine was shown, and condensation of the melt in urine was checked.

[0024] While the two above-mentioned kinds of combination showed the dye affinity equivalent to a SUTERUNHAIMA strange method (New Sternheimer), it has checked that there was no condensation ability (each number of counts is two-piece/microl). The same operation is acquired even if it uses a trypan blue (Trypan blue) instead of Evans Blue (Evansblue). In addition, the SUTERUNHAIMA strange method has checked also increasing condensation ability, when the addition of a stain solution was increased, in order to raise a dye affinity.

[0025] [Example of experiment 4] In order that a stain solution might investigate the effect which it has on an erythrocyte again, in 1ml of samples which added healthy people whole blood to the physiological saline, 400microl addition of Evans Blue (Evans blue), Erythrosine (Erythrosine), the phloxine (Phloxine), and the SUTERUNHAIMA malvin (Sternheimer-Malbin) dyeing reagent was carried out, and the erythrocyte not hemolyzing was calculated with Fuchs-Rosenthal hemocytometer.

[0026] Drawing 3 is the diagram showing the relation between each dyeing reagent and an erythrocyte survival rate. As shown in the bar graph of drawing 3, hemolysis occurs in the phloxine (Phloxine), and it has checked that there was no hemolysis in the other coloring matter.

[0027] Furthermore, about the phloxine (Phloxine), for the purpose of gestalt maintenance of an erythrocyte, the glutaraldehyde was added so that it might become 3%. Drawing 4 is the diagram showing the relation of the erythrocyte survival rate at the time of adding a fixed agent to the phloxine. The depressor effect of the hemolysis of a fixed agent is remarkable as shown in drawing 4.

[0028] [Example of experiment 5] When sodium dodecyl sulfate was added for the purpose of improvement in a dye affinity again in either of Evans Blue (Evans blue) or trypan blues (Trypan blue) with a little low dye affinity, and the combination of eosine (Eosin) so that it might become 0.1%, it checked that dyeing unevenness was lost in the visual observation under the microscope of various material components. In addition, at this time, for the purpose of gestalt maintenance, the glutaraldehyde was added so that it might become 3%.

[0029]

[Function] The work of each above-mentioned engineering practice is as follows. If it mixes with the urine sample in front of for example, an urinary sediment object or centrifugal, the dyeing reagent concerning this invention dyes only a material component specifically, and can offer a chromatic figure with sufficient visibility. Especially, there is no agglutination of melts, such as sugar in a sample, protein, and glycoprotein, and the inequality of the actual existence number and the calculation number which are produced by mistaking an aggregate for a cylinder or incorporating various material components, such as a cell, a cylinder, and a corpuscle, in an aggregate can be prevented. Furthermore, when performing an image processing, malfunction of an image processing system can be prevented.

[0030] Moreover, since said dyeing reagent does not generate precipitate even if it does not produce the crystal resulting from a stain solution and carries out two or more mixing of those coloring matter, it controls generating of the impurity of a stain solution proper, and can improve the discernment precision of the extracellular concreteness component which exists in a sample. Furthermore, hemolysis of an erythrocyte can be prevented by choosing coloring matter without hemolysis.

[0031] The operation of the dyeing reagent concerning this invention can prevent hemolysis of an erythrocyte by adding and using a fixed agent also about a dyeing reagent with hemolysis. Moreover, by adding and using a surfactant also about a little low dyeing reagent of a dye affinity, dyeing unevenness is abolished and a dye affinity can be improved. The above-mentioned dyeing reagent can inspect the urine sample containing an urinary sediment object or the concreteness component in urine before centrifugal separation processing.

[0032]

[Example]

[Example 1] The dyeing reagent concerning one example of this invention and its preparation approach are explained. Using a 1/15 mol [/.] phosphate buffer solution (pH6.8) as a solvent, it mixed I capacity at a time, and II liquid of I liquid of the Evans Blue (Evans blue) solution of 3.2x1/102 mol/l and the Erythrosine (Erythrosine) solution of 6.3x1/102 mol/l was prepared, respectively, and further, as a stabilizer, the sodium azide was filtered after addition so that it might become 0.1%, and the dyeing reagent for urinary sediment was prepared. The urine sample in front of the dregs object for nightsoil or centrifugal was mixed by the ratio of 10 into the above-mentioned reagent 1, and good dyeing of visibility was able to be performed only to the material component, without causing condensation of the sugar which is dissolving into a sample, protein, and glycoprotein.

[0033] [Example 2] The dyeing reagent concerning other one example of this invention, its preparation approach, and operation are explained. The 1/15 mol [/.] phosphate buffer solution (pH6.8) was used for the solvent, after mixing a sodium azide like [example 1] as a stabilizer to . pan which it mixed at a time I capacity, and prepared II liquid of I liquid of the Evans Blue (Evans blue) solution of 2x1/102 mol/l, and the phloxine (Phloxine) solution of 6.3x1/102 mol/l, respectively, it filtered and the dyeing reagent for urinary sediment was prepared.

[0034] The urine sample in front of the dregs object for nightsoil or centrifugal was mixed by the ratio of the capacity of 10 in the capacity of the above-mentioned reagent 1, and the visibility of only a material component was able to perform good dyeing, without causing condensation of the sugar which is dissolving into a sample, protein, and glycoprotein. However, for the erythrocyte protection from the hemolysis of an erythrocyte occurring, as a fixed agent, the glutaraldehyde was used for the phloxine (Phloxine) solution of this dyeing reagent, having added so that it might become 3%, and it acquired the effectiveness of material component stabilization.

[0035] [Example 3] The dyeing reagent concerning other one example of this invention, its preparation approach, and operation are explained. It mixed at a time I capacity of II liquid of I liquid of the Evans Blue (Evans blue) solution of 3.2x1/102 mol/l which used and prepared the 1/15 mol [/.] phosphate buffer solution (pH6.8) to the solvent, and the eosine (Eosin) solution of 6.3x1/102 mol/l, respectively, and further, it mixed like [example 1], the stabilizer was filtered, and the dyeing reagent for urinary

sediment was prepared.

[0036] The urine sample in front of the dregs object for nightsoil or centrifugal was mixed by the ratio of 10 capacity in 1 capacity of the above-mentioned reagent, and dyeing with visibility sufficient [ a material component ] was able to be performed, without causing condensation of the sugar which is dissolving into a sample, protein, and glycoprotein. However, since the eosine (Eosin) solution of this dyeing reagent had dyeing unevenness in dyeing of various material components, it was added and used and it acquired the stable dyeing effectiveness so that it might become 0.1% about the sodium dodecyl sulfate of a surface active agent for unification of a dye affinity. In addition, for the purpose of gestalt maintenance, the glutaraldehyde was added so that it might become 3%.

[0037]

[Effect of the Invention] As mentioned above, according to this invention, as explained to the detail, condensation of melts, such as protein in urine, sugar, and glycoprotein, is not caused, the tyrosine's crystal is not produced, there is no erythrocyte hemolysis of a stain solution reason, and it excels in the visibility of the concreteness component in urine, and calculation of a number of red cell is exact, and the dyeing reagent with which the chromatic figure also suitable for an image processing is obtained, its method of preparation, and its operation can be offered.

---

[Translation done.]



**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

**[Brief Description of the Drawings]**

[Drawing 1] It is the diagram showing the relative color tone of cytoplasm, and a nuclear relative color tone.

[Drawing 2] It is the diagram showing relation with the aggregate in dyeing urine and its urine.

[Drawing 3] It is the diagram showing the relation between each dyeing reagent and an erythrocyte survival rate.

[Drawing 4] It is the diagram showing the relation of the erythrocyte survival rate at the time of adding a fixed agent to the phloxine.

[Translation done.]

\* NOTICES \*

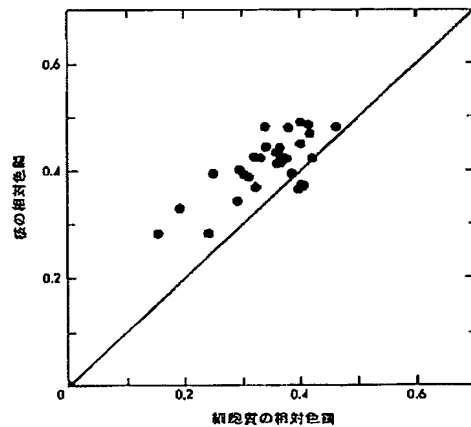
JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

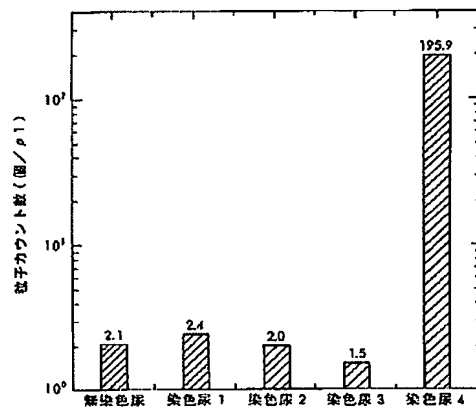
[Drawing 1]

図 1



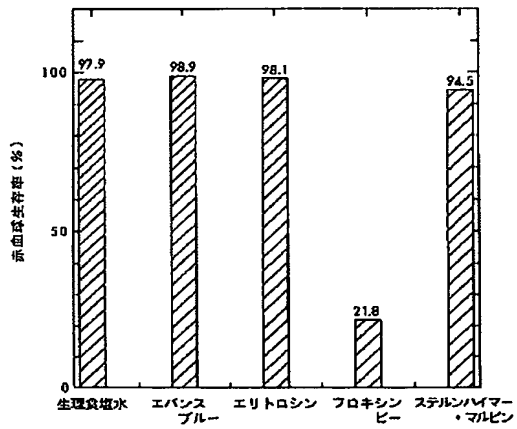
[Drawing 2]

図 2



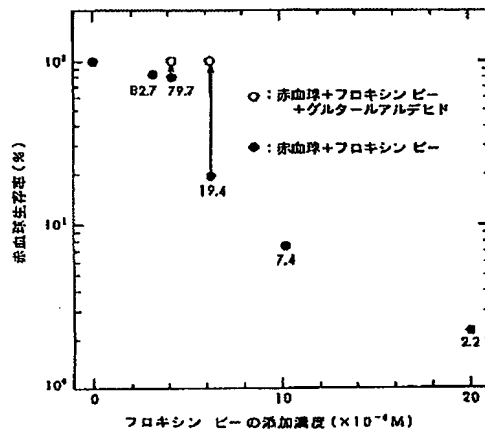
[Drawing 3]

図 3



[Drawing 4]

図 4



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-110328

(43) 公開日 平成7年(1995)4月25日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/48

1/30

識別記号

P

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平5-252699

(22) 出願日 平成5年(1993)10月8日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 小島 康明

茨城県勝田市大字市毛882番地 株式会社

日立製作所計測器事業部内

(72) 発明者 矢辺 良平

茨城県勝田市大字市毛882番地 株式会社

日立製作所計測器事業部内

(72) 発明者 服部 充雄

茨城県勝田市堀口字長久保882番地2 株

式会社日計測エンジニアリング株式会社内

(74) 代理人 弁理士 高橋 明夫 (外1名)

最終頁に続く

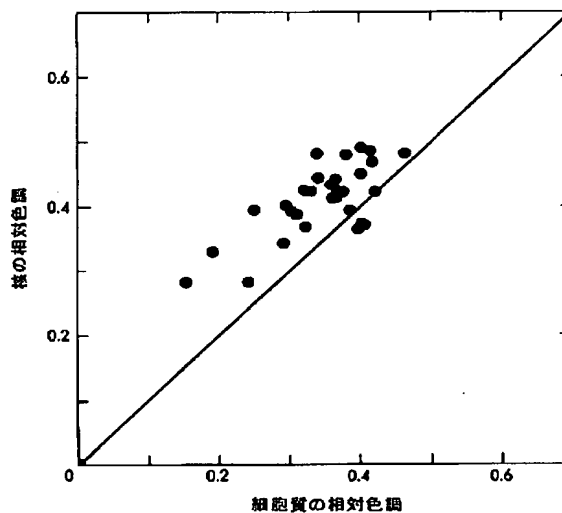
(54) 【発明の名称】 染色試薬とその調整方法およびその使用方法

(57) 【要約】

【目的】 サンプル中の有形成分の視認性に優れ、サンプル中の蛋白質、糖、糖蛋白質などの溶解物の凝集を引き起こさない有用性の高い染色試薬を提供する。

【構成】 約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのエバンスブルー1容量と、約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのエリトロシン約0.5~2.0容量とを混合し、前記混合溶液に約0.01~1.0%の濃度となるようにアジ化ナトリウムまたはパラヒドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかを添加し、溶媒として1/30~1/5mol/lのリン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかを用い、pHが5.7~7.9になるようにしたものである。

図 1



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞・組織染色用色素とpH緩衝液と安定剤とからなる生体試料の染色試薬であって、前記細胞・組織染色用色素は、無極性分子の複数の染色用色素からなり、相互に混和しても反応して凝集・沈殿を起さず、かつ、前記生体試料中の糖、蛋白質、糖蛋白質などの溶解物を析出、凝集させず、かつ、複数の染色対象物については、その種類ごとに異なった色調または染色強度により染め分け、同一の対象物については、その構成物ごとに異なった色調あるいは染色強度で染め分けるようにしたことを特徴とする染色試薬。

【請求項2】 複数の染色用色素は、超生体染色に用いられるアゾ染料とキサンテン染料とであることを特徴とする請求項1記載の染色試薬。

【請求項3】 アゾ染料は、エバンスブルーまたはトリパンプルーのいずれかであることを特徴とする請求項2記載の染色試薬。

【請求項4】 キサンテン染料は、エリトロシンまたはフロキシシンあるいはエオシンのいずれかであることを特徴とする請求項2または3記載のいずれか染色試薬。

【請求項5】 pH緩衝液は、リン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかであることを特徴とする請求項1ないし4記載のいずれかの染色試薬。

【請求項6】 安定剤は、抗菌剤であることを特徴とする請求項1ないし5記載のいずれかの染色試薬。

【請求項7】 抗菌剤は、アジ化ナトリウム物またはパラハイドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかであることを特徴とする請求項6記載の染色試薬。

【請求項8】 約 $0.2 \sim 10.0 \times 1/10^2 \text{ mol/l}$ のエバンスブルーまたはトリパンプルーのいずれか1容量と、約 $0.2 \sim 10.0 \times 1/10^2 \text{ mol/l}$ のエリトロシン約 $0.5 \sim 2.0$ 容量とを混合し、前記混合溶液に約 $0.01 \sim 1.0\%$ の濃度となるようにアジ化ナトリウムまたはパラハイドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかを混合し、溶媒として $1/30 \sim 1/5 \text{ mol/l}$ のリン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかをを用い、pHが $5.7 \sim 7.9$ になるようにすることを特徴とする染色試薬の調製方法。

【請求項9】 細胞・組織染色用色素とpH緩衝液と安定剤とからなる染色試薬に固定化剤を添加して使用することを特徴とする染色試薬の使用法。

【請求項10】 約 $0.2 \sim 10.0 \times 1/10^2 \text{ mol/l}$ のエバンスブルーまたはトリパンプルーのいずれか1容量と、約 $0.2 \sim 10.0 \times 1/10^2 \text{ mol/l}$ のフロキシシン約 $0.5 \sim 2.0$ 容量とを混合し、前記混合溶液に約 $0.01 \sim 1.0\%$ の濃度となるようにアジ化ナトリウムまたはパラハイドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸

のいずれかを混合し、溶媒として $1/30 \sim 1/5 \text{ mol/l}$ のリン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかをを用い、pHが $5.7 \sim 7.9$ になるように調整した染色試薬に、固定化剤として、 $0.02 \sim 5.0\%$ と濃度となるようにグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒドまたはパラホルムアルデヒドのいずれかを添加して使用することを特徴とする請求項9記載の染色試薬の使用法。

【請求項11】 細胞・組織染色用色素とpH緩衝液と安定剤とからなる染色試薬に固定化剤と界面活性剤とを添加して使用することを特徴とする染色試薬の使用法。

【請求項12】 約 $0.2 \sim 10.0 \times 1/10^2 \text{ mol/l}$ のエバンスブルー1容量と、約 $0.2 \sim 10.0 \times 1/10^2 \text{ mol/l}$ のエオシン約 $0.5 \sim 2.0$ 容量とを混合し、前記混合溶液に約 $0.01 \sim 1.0\%$ の濃度となるようにアジ化ナトリウムまたはパラハイドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかを混合し、溶媒として $1/30 \sim 1/5 \text{ mol/l}$ のリン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかをを用い、pHが $5.7 \sim 7.9$ になるように調整した染色試薬に、固定化剤として、 $0.02 \sim 5.0\%$ と濃度となるようにグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒドまたはパラホルムアルデヒドのいずれかと、界面活性剤として、 $0.01 \sim 0.5\%$ の濃度となるようにドデシル硫酸ナトリウムとを添加して使用することを特徴とする請求項11記載の染色試薬の使用法。

【請求項13】 約 $0.2 \sim 10.0 \times 1/10^2 \text{ mol/l}$ のトリパンプルー1容量と、約 $0.2 \sim 10.0 \times 1/10^2 \text{ mol/l}$ のエオシン約 $0.5 \sim 2.0$ 容量とを混合し、前記混合溶液に約 $0.01 \sim 1.0\%$ の濃度となるようにアジ化ナトリウムまたはパラハイドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかを混合し、溶媒として $1/30 \sim 1/5 \text{ mol/l}$ のリン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかをを用い、pHが $5.7 \sim 7.9$ になるように調整した染色試薬に、固定化剤として、 $0.02 \sim 5.0\%$ と濃度となるようにグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒドまたはパラホルムアルデヒドのいずれかと、界面活性剤として $0.01 \sim 0.5\%$ の濃度となるようにドデシル硫酸ナトリウムとを添加して使用することを特徴とする請求項11記載の染色試薬の使用法。

【請求項14】 染色対象の生体試料が、尿沈渣有形成分であることを特徴とする請求項1ないし13のいずれかの染色試薬の使用法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、赤血球、白血球、上皮

細胞などの生体試料染色用の染色試薬に関するもので、特に尿のように赤血球、白血球、上皮細胞などの細胞成分のほか同一試料内に色素の沈殿物、尿中成分の析出・凝集物、粉塵混入物などの夾雑物と識別が難しい細胞外有形成分、すなわち結晶、円柱などを含む生体試料を染色するような染色試薬とその調製方法およびその使用方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】本発明の染色試薬および調製方法に最も近い公知例としては、検査と技術 医学書院刊 vol. 10 No. 9 (1982:9) p846~p850、特開平5-40118号公報等記載の技術が挙げられる。従来の尿沈渣染色試薬には、上記の検査と技術 医学書院刊 vol. 10 No. 9 (1982:9) p846~p850、特開平5-40118号公報等記載の技術にもあるように、ステルンハイマー (Sternheimer) 染色試薬、ステルンハイマー変法 (New Sternheimer) 染色試薬、ステルンハイマー・マルビン (Sternheimer-Malbin) 染色試薬などが存在する。

【0003】前記ステルンハイマー染色試薬は、2%ナショナルファーストブルー (National fast blue) 水溶液のI液と、1.5%ピロニンB (Pyronin B) 水溶液のII液とからなり、この染色試薬を調製するには、I液とII液を1:1の割合で混合していた。また、ステルンハイマー変法染色試薬は、2%アルシアンブルー (Alcian blue) 水溶液のI液と、1.5%ピロニンB (Pyronin B) 水溶液のII液とからなり、この染色試薬を調製するには、I液とII液を2:1の割合で混合していた。

【0004】前記ステルンハイマー・マルビン染色試薬は、クリスタルバイオレット3.0gを95%エチルアルコール20.0mlに溶解し、これにシュウ酸アンモニウム0.8gを添加して精製水80.0mlで希釈してなるI液と、サフラニン00.25gを95%エチルアルコール10.0mlに溶解し、これを精製水100.0mlで希釈してなるII液とからなり、この染色試薬を調製するには、I液とII液を3:97の割合で混合していた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記従来のステルンハイマー染色試薬およびステルンハイマー変法染色試薬を用いた尿沈渣の染色法は、尿中有形成分の視認性に優れた有用性の高い超生体染色法である。しかし、前記染色試薬は、その構成色素分子内の電荷分布が偏在する有極性分子であるため尿との混和時、尿中蛋白質、糖、糖蛋白質などの溶解物の凝集が引き起こされ、これを円柱と見誤ったり、凝集塊の中に細胞、円柱、血球などが隠された場合、前記各種有形成分を見落とすことがある。さらに、前記各種有形成分を画像処理する場合、画像処理

装置の誤動作の原因となるという大きな課題があった。

【0006】また、ステルンハイマー・マルビン染色試薬を用いた尿沈渣の染色法は、上記染色法より尿中有形成分の視認性に劣り、かつ、ときとしてチロジン様の針状の結晶を生じ、尿中由来の結晶と見誤ってしまうという大きな課題を有していた。また、赤血球溶血作用による赤血球数の算定が不正確になるという課題があった。

【0007】そこで本発明は、上記技術的課題を解決するためになされたもので、尿中蛋白質、糖、糖蛋白質などの溶解物の凝集を引き起さず、チロジン様の結晶を生じさせず、染色液起因の赤血球溶血作用がなく、尿中有形成分の視認性にすぐれ、赤血球数の算定が正確であり、画像処理にも適する染色像が得られる染色試薬とその調整方法およびその使用方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために本発明に係る生体試料の染色試薬は、細胞・組織染色用色素とpH緩衝液と安定剤とからなる生体試料の染色試薬であって、前記細胞・組織染色用色素は、無極性分子の複数の染色用色素からなり、相互に混和しても反応して凝集・沈殿を起さず、かつ、前記生体試料中の糖、蛋白質、糖蛋白質などの溶解物を析出、凝集させず、かつ、複数の染色対象物については、その種類ごとに異なった色調または染色強度により染め分け、同一の対象物については、その構成物ごとに異なった色調あるいは染色強度で染め分けるようにしたことを特徴とする。

【0009】複数の染色用色素は、超生体染色に用いられるアゾ染料とキサンテン染料とであることを特徴とする。アゾ染料は、エバンスブルーまたはトリパンプルーのいずれかであることを特徴とする。キサンテン染料は、エリトロシンまたはフロキシンあるいはエオシンのいずれかであることを特徴とする。pH緩衝液は、リン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかであることを特徴とする。安定剤は、抗菌剤であることを特徴とする。前記抗菌剤は、アジ化ナトリウム物またはパラハイドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかであることを特徴とする。

【0010】上記目的を達成するために本発明に係る生体試料の染色試薬の調整法は、約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのエバンスブルーまたはトリパンプルーのいずれか1容量と、約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのエリトロシン約0.5~2.0容量とを混合し、前記混合溶液に約0.01~1.0%の濃度となるようにアジ化ナトリウムまたはパラハイドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかを混合し、溶媒として1/30~1/5mol/lのリン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかを用い、pHが5.7~7.

9になるようにすることを特徴とする。

【0011】上記目的を達成するために本発明に係る生体試料の染色試薬の使用方法は、細胞・組織染色用色素とpH緩衝液と安定剤とからなる染色試薬に固定化剤を添加して使用することを特徴とする。約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのエバンスブルーまたはトリパンブルーのいずれか1容量と、約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのプロキシシン約0.5~2.0容量とを混合し、前記混合溶液に約0.01~1.0%の濃度となるようにアジ化ナトリウムまたはパラヒドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかを混合し、溶媒として1/30~1/5mol/lのリン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかをを用い、pHが5.7~7.9になるように調整した染色試薬に、固定化剤として、0.02~5.0%と濃度となるようにグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒドまたはパラホルムアルデヒドのいずれかを添加して使用することを特徴とする。

【0012】また、細胞・組織染色用色素とpH緩衝液と安定剤とからなる染色試薬に固定化剤と界面活性剤とを添加して使用することを特徴とする。約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのエバンスブルー1容量と、約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのエオシン約0.5~2.0容量とを混合し、前記混合溶液に約0.01~1.0%の濃度となるようにアジ化ナトリウムまたはパラヒドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかを混合し、溶媒として1/30~1/5mol/lのリン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかをを用い、pHが5.7~7.9になるように調整した染色試薬に、固定化剤として、0.02~5.0%と濃度となるようにグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒドまたはパラホルムアルデヒドのいずれかと、界面活性剤として、0.01~0.5%の濃度となるようにドデシル硫酸ナトリウムとを添加して使用することを特徴

とする。

【0013】また、約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのトリパンブルー1容量と、約0.2~10.0×1/10<sup>2</sup>mol/lのエオシン約0.5~2.0容量とを混合し、前記混合溶液に約0.01~1.0%の濃度となるようにアジ化ナトリウムまたはパラヒドロキシフェニル酢酸またはデヒドロ酢酸あるいはエチレンジアミンテトラ硫酸のいずれかを混合し、溶媒として1/30~1/5mol/lのリン酸液またはコハク酸液あるいはトリス酸液のいずれかをを用い、pHが5.7~7.9になるように調整した染色試薬に、固定化剤として、0.02~5.0%と濃度となるようにグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒドまたはパラホルムアルデヒドのいずれかと、界面活性剤として、0.01~0.5%の濃度となるようにドデシル硫酸ナトリウムとを添加して使用することを特徴とする。染色対象の生体試料が、尿沈渣有形成分であることを特徴とする。

【0014】本発明に係る尿沈渣染色用試薬の組成とその調製方法とを決定するにあたって下記の実験を行なった。各実験結果は表1~2、図1~4に示した。

〔実験例 1〕まず、細胞・組織染色用色素を中心に、分子内の電荷が偏在していないと推察される構造式を持つ色素約40種類をアジン系色素、キサンテン系色素、アゾ系色素、チアジン系色素、トリフェニルメタン系色素等を中心に選択した。

【0015】そして、6.3×1/10<sup>3</sup>mol/lに調製した染色液80μlに健常人尿200μlを添加し、尿中蛋白質、糖、糖蛋白質などの凝集が起こるか、顕微鏡観察にて確認した。その結果、凝集を引き起こさない色素として〔表1〕に示す13種類(赤系6種類、青系7種類)の色素を得た。

【0016】〔表1〕は、細胞・組織染色用色素を検討した結果、尿中溶解物の凝集能がないことが明らかになった色素のリストである。なお、C. I. No. とは、カラーインデックスナンバーを意味する。

【表1】

No.	色 素 名	C. I. No.	ピーク波長(nm)
1	ニュートラル レッド	50040	530.6
2	エオシン ワイ	45380	516.4
3	フロキシシン ビー	45410	538.2
4	エリトロシン	45430	526.4
5	コンゴ レッド	22120	498.2
6	アゾカルミン ジェフェム	50085	523.4
7	メチレン ブルー	52015	590.0
8	エバンス ブルー	23860	608.0
9	アズール ビー	52010	646.4
10	メチレン グリーン	42590	632.0
11	ファスト グリーン エフシエフ	42053	623.0
12	ニューメチレン ブルー	52030	590.2
13	トリパン ブルー	23850	589.0

【0017】〔実験例 2〕つぎに、〔表2〕に示すマトリクスに従って、赤系の色素と青系の色素の組合せによる凝集による沈殿物発生の有無を顕微鏡観察にて確認した。そして、 $6.3 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ に調製した染色液を $50 \mu\text{l}$ づつ混合した結果、表中○または◎で示す25通りの色素組み合わせによる沈殿物、または\*

\*色素固有の結晶が発生しないことを確認した。

【0018】〔表2〕は、複数の色素の組み合わせにおける沈殿物の発生の有無を示すもので、沈殿物を発生するものは×、発生しないものは○、発生せず、かつ、細胞の染色性が良好なものは◎の表記とした。

【表2】

赤系色素	ニュートラル レッド	エオシン ワイ	フロキシ シン ビー	エリトロ シン	コンゴ レッド	アゾカル ミンジェ フェム
青系色素						
メチレン ブルー	○	×	×	×	×	×
エバンス ブルー	○	◎	◎	◎	○	○
アズール ビー	○	○	○	○	×	○
メチレン グリーン	○	×	×	×	×	×
ファスト グリーン	×	○	○	○	○	○
ニューメチレン ブルー	○	×	×	×	×	×
トリパン ブルー	○	○	○	◎	○	○

【0019】さらに、25通りの組合せから細胞の染色性の良い組合せを得るため、染色液 $80 \mu\text{l}$ と健常人尿 $200 \mu\text{l}$ を混合し、上皮細胞の核と細胞質の染めわけができる組合せを検討した。その結果、上記〔表2〕中において、◎で示す4通りの組合せで良好な染色性を得た。

【0020】図1は、細胞質の相対色調と核の相対色調とを示す線図である。図1においては、エバンスブルー (Evans blue) とエリトロシン (Erythrosine) の組み合わせで染色したときの上皮細胞の核と細胞質の色調を測光スポット径約 $2 \mu\text{m}$ の顕微分光光度計で測定し、エバンスブルー (Evans blue) のピークとエリトロシン (Erythrosine) のピークの比を求めた結果を示している。これより、本発明に係る染色色素が、細胞核を青く、細胞質を赤く染色することを確認した。

【0021】〔実験例 3〕特に、染色性の良好であった4通りの組合せ中、エバンスブルー (Evans bl

ue) とエリトロシン (Erythrosine)、エバンスブルー (Evans blue) とフロキシシン (Phloxine) の2通りの組合せについて、尿中溶解物 (蛋白質、糖、糖蛋白質など) の凝集能を、ステルンハイマー変法 (New Sternheimer) 染色試薬、ステルンハイマー・マルビン (Sternheimer-Malbin) 染色試薬と比較検討した。各染色液 $400 \mu\text{l}$  (無染色は生理食塩水 $400 \mu\text{l}$ ) と健常人尿 $1 \text{ ml}$ を混合し、粒子カウンターを用いて粒子数を比較した。

【0022】なお、染色液の組成は以下の通りである。  
 染色尿1…ステルンハイマー・マルビン (Sternheimer-Malbin) 染色試薬+健常人尿  
 染色尿2…エバンスブルー (Evans blue) とフロキシシン (Phloxine) +健常人尿  
 染色尿3…エバンスブルー (Evans blue) とエリトロシン (Erythrosine) +健常人尿  
 染色尿4…ステルンハイマー変法 (New Stern



heimer) 染色試薬+健常人尿

【0023】図2は、染色尿とその尿中の凝集物との関係を示す線図である。その結果は、図2の棒グラフに示すごとく、ステルンハイマー変法(New Sternheimer)尿のカウント数は196個/ $\mu$ lで、無染色尿のカウント数(2個/ $\mu$ l)の90倍の値を示し尿中溶解物の凝集が確認された。

【0024】上記2通りの組合せは、ステルンハイマー変法(New Sternheimer)と同等の染色性を示す一方で凝集能のないこと(カウント数はいずれも2個/ $\mu$ l)が確認できた。トリパンブルー(Trypan blue)をエバンスブルー(Evans blue)の代わりに用いても同様の作用が得られる。なお、ステルンハイマー変法は、染色性を上げるために染色液の添加量を増加すると凝集能も増加することが確認できた。

【0025】〔実験例 4〕また、染色液が赤血球に与える影響を調べるため、生理食塩水に健常人全血を加えた試料1mlにエバンスブルー(Evans blue)、エリトロシン(Erythrosine)、フロキシシン(Phloxine)、ステルンハイマー・マルビン(Sternheimer-Malbin)染色試薬を400 $\mu$ l添加し、溶血しない赤血球をフックス・ローゼンタール計算盤により算定した。

【0026】図3は、各染色試薬と赤血球生存率との関係を示す線図である。図3の棒グラフに示すようにフロキシシン(Phloxine)では溶血作用があり、それ以外の色素には溶血作用の無いことが確認できた。

【0027】さらに、フロキシシン(Phloxine)については、赤血球の形態保持を目的としてグルタルアルデヒドを3%となるよう添加した。図4は、フロキシシンに固定化剤を添加した場合の赤血球生存率の関係を示す線図である。図4に示す通り固定化剤の溶血作用の抑制効果が顕著である。

【0028】〔実験例 5〕また、染色性がやや低いエバンスブルー(Evans blue)またはトリパンブルー(Trypan blue)のいずれかと、エオシン(Eosin)の組み合わせにおいて、染色性の向上を目的としてドデシル硫酸ナトリウムを0.1%となるよう添加したところ、各種有形成分の顕微鏡による目視観察において染色むらがなくなることを確認した。なお、このとき、形態保持を目的としてグルタルアルデヒドを3%となるよう添加した。

【0029】

【作用】上記各技術的手法の働きは、次のとおりである。本発明に係る染色試薬は、例えば尿沈渣物あるいは遠心前の尿試料と混合すると有形成分のみ特異的に染色し、視認性の良い染色像を提供できる。特に、試料中の糖、蛋白質、糖蛋白質などの溶解物の凝集作用がなく、凝集物を円柱と見誤ったり、凝集塊の中に細胞、円柱、

血球などの各種有形成分を取り込むことにより生ずる实在個数と算定個数との不一致を防止することができる。さらに、画像処理を行う場合には、画像処理装置の誤動作を防止することができる。

【0030】また、前記染色試薬は、染色液に起因する結晶を生じさせず、それらの色素を複数混和させても沈殿物を発生しないので、染色液固有の夾雑物の発生を抑制し、試料中に存在する細胞外有形成分の識別精度を向上できる。さらに、溶血作用のない色素を選択することで赤血球の溶血を防止することができる。

【0031】本発明に係る染色試薬の使用方法は、溶血作用のある染色試薬に関しても、固定化剤を添加して使用することにより、赤血球の溶血を防止することができる。また、染色性のやや低い染色試薬に関しても、界面活性剤を添加し使用することにより、染色むらをなくし、染色性を向上できる。上記染色試薬は、尿沈渣物または遠心分離処理前の尿中有形成分を含む尿試料を検査することができる。

【0032】

【実施例】

〔実施例 1〕本発明の一実施例に係る染色試薬およびその調製方法を説明する。溶媒として1/15mol/lのリン酸緩衝液(pH6.8)を用い、3.2 $\times$ 10<sup>2</sup>mol/lのエバンスブルー(Evans blue)溶液のI液と、6.3 $\times$ 10<sup>2</sup>mol/lのエリトロシン(Erythrosine)溶液のII液をそれぞれ1容量ずつ混合して調製し、さらに安定剤として、アジ化ナトリウムを0.1%になるように添加後、濾過して尿沈渣用染色試薬を調製した。上記試薬1に対し尿沈渣物あるいは遠心前の尿試料を10の比率で混合して、試料中に溶解している糖、蛋白質、糖蛋白質の凝集を引き起こすことなく、有形成分のみに対して視認性の良好な染色を行なうことができた。

【0033】〔実施例 2〕本発明の他の一実施例に係る染色試薬およびその調製方法および使用方法を説明する。溶媒に1/15mol/lのリン酸緩衝液(pH6.8)を用い、2 $\times$ 10<sup>2</sup>mol/lのエバンスブルー(Evans blue)溶液のI液と、6.3 $\times$ 10<sup>2</sup>mol/lのフロキシシン(Phloxine)溶液のII液をそれぞれ1容量ずつ混合して調製した。さらに安定剤としてアジ化ナトリウムを〔実施例1〕と同様に混合したのち、濾過して尿沈渣用染色試薬を調製した。

【0034】上記試薬1の容量に対し尿沈渣物あるいは遠心前の尿試料を10の容量の比率で混合して、試料中に溶解している糖、蛋白質、糖蛋白質の凝集を引き起こすことなく、有形成分のみの視認性が良い染色を行なうことができた。しかし、本染色試薬のフロキシシン(Phloxine)溶液は、赤血球の溶血作用があることから赤血球保護のため固定化剤としてグルタルアルデヒ

ドを 3% となるよう添加して使用し、有形成分安定化の効果をえた。

【0035】〔実施例 3〕本発明の他の一実施例に係る染色試薬およびその調製方法および使用方法を説明する。溶媒に  $1/15 \text{ mol/l}$  のリン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いて調製した  $3.2 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$  のエバンスブルー (Evans blue) 溶液の I 液と、 $6.3 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$  のエオシン (Eosin) 溶液の II 液をそれぞれ 1 容量づつ混合し、さらに安定剤を〔実施例 1〕と同様に混合し、濾過して尿沈渣用染色試薬を調製した。

【0036】上記試薬の 1 容量に対し尿沈渣物あるいは遠心前の尿試料を 10 容量の比率で混合して、試料中に溶解している糖、蛋白質、糖蛋白質の凝集を引き起こすことなく、有形成分のみ視認性良い染色を行なうことができた。しかし、本染色試薬のエオシン (Eosin) 溶液は、各種有形成分の染色において染色むらがあることから、染色性の統一のため界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウムを 0.1% となるよう添加して使用し、安定\*

した染色効果をえた。なお、形態保持を目的としてグルタルアルデヒドを 3% となるよう添加した。

【0037】

【発明の効果】以上、詳細に説明した如く、本発明によれば、尿中蛋白質、糖、糖蛋白質などの溶解物の凝集を引き起さず、チロジン様の結晶を生じさせず、染色液起因の赤血球溶血作用がなく、尿中有形成分の視認性にすぐれ、赤血球数の算定が正確であり、画像処理にも適する染色像が得られる染色試薬とその調製法およびその使用方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】細胞質の相対色調と核の相対色調とを示す線図である。

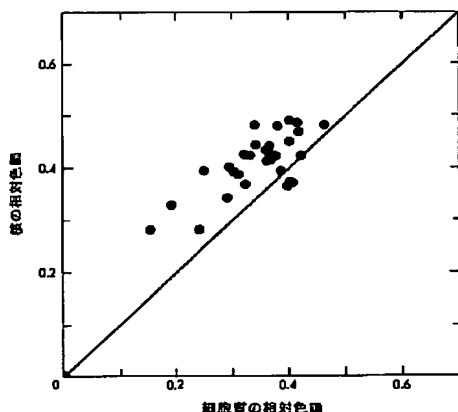
【図 2】染色尿とその尿中の凝集物との関係を示す線図である。

【図 3】各染色試薬と赤血球生存率との関係を示す線図である。

【図 4】フロキシシンに固定化剤を添加した場合の赤血球生存率の関係を示す線図である。

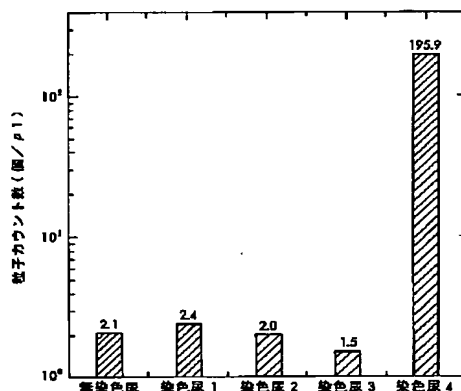
【図 1】

図 1



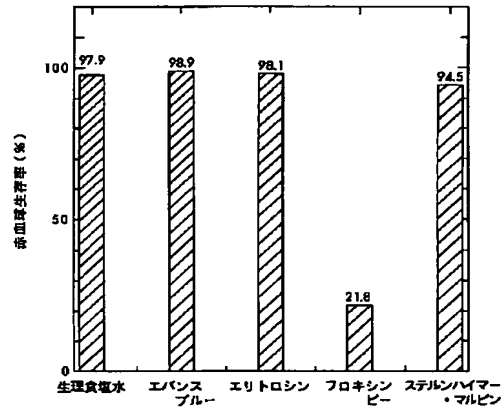
【図 2】

図 2



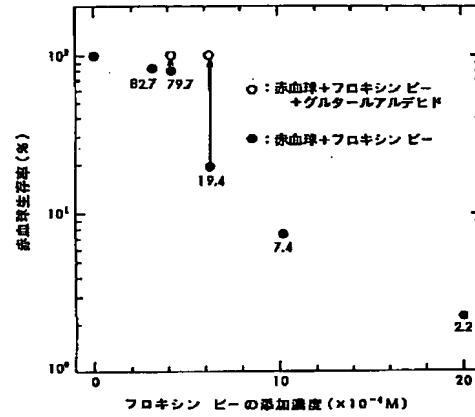
【図3】

図 3



【図4】

図 4



フロントページの続き

(72)発明者 川瀬 一光  
茨城県勝田市大字市毛882番地 株式会社  
日立製作所計測器事業部内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**